



**Prioritätsbescheinigung über die Einreichung  
einer Patentanmeldung**

**Aktenzeichen:** 101 06 295.8  
**Anmeldetag:** 02. Februar 2001  
**Anmelder/Inhaber:** GAIFAR German American Institute for  
Applied Biomedical Research GmbH, Potsdam/DE  
**Bezeichnung:** Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen,  
welches immobilisiert ist  
**IPC:** C 07 K 17/00

**Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ur-  
sprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.**

München, den 24. Januar 2002  
**Deutsches Patent- und Markenamt**  
Der Präsident  
Im Auftrag

*Jerofsky*

# Albrecht, Lücke & Jungblut

Patentanwälte  
Gelfertstr 56, 14195 Berlin

## DE-Patentanmeldung

Dipl.-Ing. Hans Albrecht  
Patentanwalt (1933 - 1979)

Dipl.-Ing. Dierck-Wilm Lücke  
Patentanwalt / European Patent Attorney /  
European Trademark Attorney

Dipl.-Chem. Dr. Bernhard Jungblut  
Patentanwalt / European Patent Attorney /  
European Trademark Attorney

Anwaltsakte: GAI/DE/0004

Datum: 02.02.01

Anmelder: GAIFAR German American Institute for Applied Biomedical  
Research GmbH

Biotech Campus  
Hermannswerder 15/16  
D-14473 Potsdam

Titel: Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen, welches im-  
mobilisiert ist.

Erfinder: Dr. Heinrich REPKE, Zingerleweg 27, D-14089 Berlin  
Dr. Eckhard BUDDE, Lausitzer Platz 10, D-10997 Berlin

Priorität: ---

Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen, welches immobilisiert ist.

## 5 Gebiet der Erfindung

Die Erfindung betrifft ein Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen, welches immobilisiert ist, eine für ein solches Protein codierende Polynukleo-  
10 tide, einen Expressionsvektor enthaltend solche Polynukleotide, eine mittels eines solchen Expressionsvektors transformierte Zelle, sowie Verwendungen eines solchen Proteins zur Herstellung eines Immobilisats und zur Herstellung eines HIV Tests.

15

## Hintergrund der Erfindung.

Immobilisate aufweisend eine feste Phase und ein oder  
20 mehrere an der festen Phase gebundene Proteine sind vielfältig aus der Praxis bekannt. Solche Immobilisate werden einerseits zum Nachweis von an das Protein spezifisch bindenden Substanzen eines flüssigen Analysats und andererseits zur Abtrennung solcher Sub-  
25 stanzen aus einer Flüssigkeit eingesetzt. Dabei weist das Protein ein Epitop auf, welches für die nachzuweisende oder abzutrennende Substanz spezifisch ist, und dieses Epitop ist in der Regel über eine Spacer-  
erverbindung, die als solche nicht an die Substanz  
30 bindet, an die feste Phase gebunden. Die Spacer-  
verbindung gewährleistet u.a., daß das Protein sich im Bereich des Epitops in einer Weise faltet, die der Faltung des nativen Epitops entspricht. Dies, i.e. die

gewünschte Exponierung des Epitops, ist die Voraussetzung dafür, daß eine Bindung der Substanz überhaupt möglich ist. Insbesondere wird die Ausbildung unerwünschter Disulfidbrücken verhindert.

5

In manchen Bereichen der Medizin ist es wünschenswert, wenn verschiedene Epitope gleichzeitig an der festen Phase immobilisiert sind. Dies ist beispielsweise im Falle von HIV-Tests wünschenswert, da nur eine Ansammlung von Epitopen, welche für Antikörper für verschiedene HIV1 und HIV2 Stämme und Subtypen spezifisch sind, eine zuverlässige Aussage auf Basis des Testergebnisses darüber gewährleisten, ob die getestete Probe HIV Antikörper, welchen Subtyps auch immer, enthält oder nicht, i.e. ob eine Person HIV positiv ist oder nicht.

Grundsätzlich könnten die jeweiligen Proteine, beispielsweise Antigene gegen diverse HIV Antikörper, jeweils für sich an der festen Phase immobilisiert werden. Dies birgt jedoch verschiedene Probleme. Ein erstes Problem besteht darin, daß eine gleichmäßige Verteilung der Proteine, insbesondere hinsichtlich der Konzentrationen, und somit eine hinreichend gleichförmige Sensitivität für verschiedene Antikörper nicht gewährleistet werden kann. Denn verschiedene Proteine können zu Verdrängungsreaktionen an der festen Phase führen mit der Folge von in beachtlichem Maße störenden Konzentrationsunterschieden an der festen Phase, auch bei äquimolarem Auftrag. Weiterhin sind bei einer höheren Vielzahl von verschiedenen Proteinen Wechselwirkungen der verschiedenen Proteine im Zuge der Immobilisierung nicht auszuschließen. All dies

stört jedoch, wenn gleichsam ein Universaltest, beispielsweise auf HIV, hergestellt werden soll. Die vorstehenden Ausführungen treffen natürlich sinngemäß auf grundsätzlich alle Erkrankungen zu, die, je nach 5 Klassen und Subtypen des infizierenden Organismus, immunologisch unterscheidbare Antikörper in einem Körper hervorrufen können. Es versteht sich, daß gegen einen spezifischen Subtyp auch unterschiedliche Antikörper gebildet sein können.

10

Im Zusammenhang mit HIV ist folgendes ergänzend anzumerken. Die erworbene Immunschwächekrankheit AIDS (acquired immunodeficiency syndrome) wird durch das HIV verursacht. Die beiden bisher beobachteten Erreger- 15 stämme HIV-1 und HIV-2 haben eine sehr ähnlich Genomstruktur und infizieren T-Zellen über einen sehr ähnlichen Mechanismus. Sie unterscheiden sich aber immunologisch so weit, daß Antikörper gegen HIV-1 in der Regel keine Kreuzreaktion mit HIV-2 zeigen und 20 umgekehrt. Bei HIV-1 werden zudem eine Reihe von Subtypen unterschieden, wobei die Gruppe M mehrere Subtypen umfaßt (A,B,C,D,E,F und G) und der Subtyp O in eine eigene Gruppe (Gruppe O) gestellt wird. Auch zwischen den Antikörpern gegen verschiedene Subtypen 25 bestehen immunologische Unterschiede. Daher ist es schwierig, in einem einzigen Testsystem alle Subtypen, bzw. alle Antikörper hiergegen, zuverlässig zu erkennen. Dies gilt in besonderem Maße für Schnelltests, die ohne großen experimentellen Aufwand durchzuführen 30 sein müssen. In einem Schnelltest sollte durch einmaligen Auftrag beispielsweise einer Blutprobe ein zuverlässiges Ergebnis erhaltbar sein. Insbesondere im

Zusammenhang mit HIV müssen falsch negative und falsch positive Ergebnisse praktisch ausgeschlossen sein.

## 5 Stand der Technik.

Beispielhaft für den Einsatz eines oder mehrerer Antigene in Mischung gegen verschiedene HIV Antikörper ist die Literaturstelle US-A-5,830,641.

10

Bisher bekannte Schnelltests arbeiten demgegenüber in Regel mit einem einzigen Antigen, nämlich gp41, und sind daher nicht in der Lage, alle HIV-Subtypen zuverlässig und mit hoher Sensitivität zu erkennen. Es

15 besteht also ein sehr beachtliches Risiko falsch negativer Ergebnisse. Sie sind zudem nicht über längere Zeit temperaturstabil, nicht für eine permanente Dokumentation geeignet, gewährleisten keine einfache und sichere Entsorgung und zeigen bei Überentwicklung  
20 ein falsch positives Ergebnis.

Fusionsproteine mit mehr als einem Epitop für HIV Antikörper sind an sich bekannt beispielsweise aus den Literaturstellen US-A-5,800,822 und US-A-5,310,876.

25 Hierbei handelt es sich um Proteine, die in Lösung im Rahmen von Labortests eingesetzt werden. Solche Labortestsysteme sind jedoch für Schnelltests aufgrund der komplexen Handhabung und dem bei Ausführung durch nicht ausgebildete Personen folglich hohen Risiko  
30 falscher Ergebnisse nicht geeignet.

Aus der Literaturstelle US-A-4,925,784 ist ein Fusionsprotein gag/env bekannt, welches auch

immobilisiert sein kann. Brückenverbindungen mit Bindungsstellen für eine Bindung mit einer festen Phase zwischen gag und env sind nicht entnehmbar. Das Fusionsprotein ist einseitig über eine Brücke an einer festen Phase gebunden.

Aus der Literaturstelle DE 197 20 914 A1 sind verschiedene Antigene gegen Antikörper verschiedener Subtypen bekannt. Die Antigene können an einer Festphase gebunden sein. Verschiedene Antigene werden als Gemisch eingesetzt. Sofern Antigen mit multiplen Epitopen angesprochen sind, so handelt es sich um Haptene, i.e. Proteine mit mehrfachen Sequenzen eines einzigen Epitop-Typs.

Die Literaturstelle US-A-5,241,047 beschreibt Peptide, welche mit Seren HIV-positiver Probanden reagieren. Dabei sind diverse Epitope unmittelbar aneinander gekoppelt und können über eine Spacersequenz am C- oder N-terminalen Ende an einer Festphase gebunden sein. Mittels einer Spacersequenz wird die Beabstandung einer Signalsequenz von einem Trägermaterial erreicht. Ein Ende der Spacersequenz ist an das Trägermaterial und das andere an ein Ende der Signalsequenz gebunden. An jede Spacersequenz ist nur eine einzige Signalsequenz gekoppelt.

Technisches Problem der Erfindung.

30

Der Erfindung liegt das technische Problem zugrunde, ein immobilisierbares Protein anzugeben, das für einen Schnelltest auf Vorliegen von Antikörpern in einer

Patientenprobe eingesetzt werden kann und in einem solchen Schnelltest zuverlässig eine Erkennung vieler bis aller Gruppen und Subtypen eines Erregers bzw. von Antikörpern hiergegen erlaubt.

5

Grundzüge der Erfindung.

Zur Lösung dieses technischen Problems lehrt die Erfindung ein Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen für Antikörper, wobei das Protein an einer Festphase über zumindest eine Bindungsstelle immobilisiert ist, und wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen über Brückenverbindungen mit der Maßgabe beabstandet sind, daß nach Bindung der Bindungsstelle an der festen Phase die Antigen-Epitop-Sequenzen für eine Bindung der zugeordneten Antikörper aus der flüssigen Phase exponiert sind.

Die Erfindung beruht auf einer Kombination von Erkenntnissen. Eine erste Erkenntnis liegt darin, daß sich die Nachteile des Einsatzes einer Mischung von Antigenen dadurch vermeiden lassen, daß die Antigen-Epitope in einem einzigen Protein kombiniert werden. Dann kann eine Immobilisierung unschwer erfolgen, ohne daß unterschiedliche Affinitäten zur Festphase und/oder Wechselwirkungen verschiedener Antigene untereinander zu störenden Verschiebungen der Verteilungen führen. Hieran anschließend beruht die Erfindung auf der weiteren Erkenntnis, daß es nicht ausreicht, lediglich verschiedene Epitope aneinander zu reihen und dann das Produkt an einem Ende (oder beiden Enden) an der Festphase zu binden. Vielmehr muß erreicht



werden, daß die Epitope nach der Immobilisierung in gewünschter Weise exponiert sind, i.e. eine Sekundär- und ggf. Tertiärstruktur bilden, die eine Bindung der zugeordneten Antikörper gewährleistet und zudem sterisch die Zugänglichkeit ermöglicht. Schließlich wurde erkannt, daß dies erreichbar ist, indem zwischen den Epitopen Brückenverbindungen eingerichtet werden, welche einerseits die Bindung an die Festphase bewirken und andererseits für die gewünschte Exponierung der Epitope sorgen. Das Konzept besteht also im Kern aus der Schaffung eines einzigen Proteins mit mehreren beabstandeten Epitopen, wobei die Epitope durch Zwischenschaltung der Brückenverbindungen wiederum gleichsam vereinzelt sind. Durch geeignete Wahl der Brückenverbindungen, insbesondere der Strukturen der beiseitig eines Epitops sich bis zu den beidseitigen Bindungsstellen an der Festphase erstreckenden Teile der jeweiligen Brückenverbindungen lassen sich zudem die Epitope auf definierte Weise falten, so daß die Exponierung sicher gewährleistet und zudem gleichsam fixiert ist. Schließlich ist der Konzeption der Erfindung inhärent, daß störende Wechselwirkungen verschiedener Epitope eines Proteins praktisch ausgeschlossen sind.

25

Geeignete Brückenverbindungen lassen sich nach Maßgabe der diese flankierenden Epitop Strukturen bzw. sequenzen mit den Mitteln des molecular modelling unschwer berechnen. Zusätzlich oder alternativ kann der Durchschnittsfachmann experimentell verschiedene Brückenverbindungen auf Eignung testen, indem die Bindungsfähigkeit von Antikörpern an die die

30

Brückenverbindung flankierenden Epitope mit üblichen Methoden getestet wird.

- Es versteht sich, daß ein erfindungsgemäßes Protein
- 5 Enden besitzen muß. Ein Ende kann das Ende eines Epitops sein, welches weder direkt noch indirekt an die Festphase gebunden ist. Ein Ende kann weiterhin ein Ende einer Brückenverbindung sein, wobei das Ende der Brückenverbindung die Bindungsstelle sein kann oder,
- 10 bezogen auf das angeschlossene Epitop, jenseits der Bindungsstelle liegen kann. Ein Ende kann schließlich auch durch ein Tag, insbesondere ein Affinitäts-Tag, gebildet sein.
- 15 Grundsätzlich gibt es verschiedene Möglichkeiten, ein erfindungsgemäßes Protein zu erstellen. Beispielsweise kann eine Brückenverbindung durch Insertion von Brückensequenzen zwischen zwei Antigen-Epitop-Sequenzen und/oder Deletion einer Teilsequenz zwischen zwei in
- 20 einer Gesamtsequenz angeordneten Antigen-Epitop-Sequenzen gebildet sein. Die Brückenverbindung kann auch durch Fusion einer Brückensequenz mit zwei Antigen-Epitop-Sequenzen gebildet sein.
- 25 Als Brückenverbindungen kommen die verschiedensten Moleküle in Frage. Grundsätzlich können beliebige organische Substanzen, typischerweise kettenartige Verbindungen, eingesetzt werden. Als Beispiele sind Oligomere auf Basis gleichartiger oder verschiedenar-
- 30 tiger Monomere der Polymerchemie zu nennen. Bevorzugt ist es, wenn die Brückenverbindung aus Aminosäuren gebildet ist. Die Brückenverbindung muß eine Bindungsstelle für die Festphase aufweisen. Üblicherweise wird

hierfür eine positiv geladene Bindungsstelle zur Bindung an eine negativ geladene Festphase, vorzugsweise eine Membran, eingerichtet.

- 5 Grundsätzlich können die Antigen-Epitop-Sequenzen innerhalb des Proteins gleich sein. Besonders bevorzugt ist es jedoch, wenn die Antigen-Epitop-Sequenzen verschiedene Antikörper binden. Idealerweise werden solche verschiedenen Antigen-Epitop-Sequenzen in einem
- 10 erfindungsgemäßen Protein oder in einigen wenigen erfindungsgemäßen Proteinen miteinander kombiniert, daß Antikörper der häufigsten, besser aller, Subtypen einer Erregergattung erkannt werden. Die Antigen-Epitop-Sequenzen können beispielsweise repetitive Se-
- 15 quenzelemente aus gleichen oder verschiedenen HIV Subtypen sein. Bevorzugt ist es allerdings, wenn die Antigen-Epitop-Sequenzen Sequenzen aus verschiedenen HIV Genen und/oder Stämmen und/oder Subtypen sind.
- 20 Grundsätzlich kann die Brückenverbindung aus einer beliebigen Sequenz gebildet sein, wobei die Brückenverbindung beispielsweise ein Sequenzelement aus gp120 ist. Bevorzugt ist es, wenn Teilsequenzen, welche im Blut enthaltene Antikörper unspezifisch binden, de-
- 25 letiert sind. Dies gilt sowohl bezüglich der Brückenverbindung als auch der Antigen-Epitop-Sequenzen.

Die Erfindung betrifft weiterhin eine Verwendung erfindungsgemäßer Proteine zur Herstellung eines Immobi-

30 lisats zur Detektion von Antikörpern, wobei zunächst das Protein in Lösung hergestellt wird, wobei dann das Protein über zumindest eine Bindungsstelle an eine Festphase gebunden wird und wobei optional die

Festphase mit dem daran gebundenen Protein zumindest einer Spülverfahrensstufe und/oder Blockierungsverfahrensstufe unterworfen wird, sowie eine Verwendung eines erfindungsgemäßen Proteins zur Herstellung eines

5 HIV Tests, wobei ein erfindungsgemäßes Immobilisat hergestellt wird, wobei dieses Immobilisat in ein Gehäuse eingesetzt wird und wobei eine Detektorlösung entweder in einer Reaktionszone des Immobilisats eingebracht ist oder separat zur Aufbringung auf das

10 Immobilisat beigelegt wird.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Polynukleotid, insbesondere cDNA, codierend für ein erfindungsgemäßes Protein, einen Expressionsvektor, vorzugsweise Plasmid, enthaltend eine Polynukleotid Sequenz kodierend

15 für ein erfindungsgemäßes Protein, und eine Zelle, welche mittels eines erfindungsgemäßen Expressionsvektors transformiert ist.

20 Die Erfindung betrifft schließlich ein Verfahren zur Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteins, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen und die Brückensequenzen ausgewählt werden und die Ordnung der Aneinanderreihung definiert wird, wobei für die Antigen-Epitop-

25 Sequenzen und die Brückensequenzen codierende DNA in einen Expressionsvektor aneinander in der definierten Weise anschließend und unter üblicher Vorschaltung eines geeigneten Promotors insertiert wird, wobei eine Zelle, vorzugsweise E. coli, mittels des Expressions-

30 vektors transformiert wird, wobei transformierte Zellen selektiert und kultiviert werden, und wobei das von den selektierten Zellen exprimierte Protein isoliert wird.

Ein erfindungsgemäßer HIV Test weist im Kern beispielsweise den folgenden Aufbau auf. In einer Ausführungsform als "flow through" befindet sich ein  
5 poröses Material, meist eine Membran, in einer Vorrichtung, beispielsweise einem Kunststoffgehäuse, welche eine Zugriffsöffnung zu der Membran aufweist. An für Flüssigkeiten zugänglichen Oberflächen der Membran ist zumindest ein erfindungsgemäßer Protein Typus  
10 immobilisiert. Durch die Zugriffsöffnung wird eine zu testende Probe, beispielsweise Blut, Serum oder Plasma, auf die Membran aufgetragen. U. a. aufgrund von Kapillarkräften dringt die Probe in die Membran ein bzw. tritt durch sie hindurch. Dies kann unter-  
15 stützt werden beispielsweise durch eine Unterfütterung der Membran mittels eines saugfähigen Materials. Die Probe bzw. darin eventuell enthaltene Antikörper reagieren mit dem Protein. Durch Auftrag einer üblichen Detektorlösung, beispielsweise gefärbte Partikel wie  
20 kolloidale Goldpartikel, erfolgt ein visueller Nachweis für die Bindung von Antikörpern an das Protein. Alternativ zur "flow through" Technologie kann mittels einem "lateral flow" Verfahren gearbeitet werden. Hierbei wird ebenfalls eine Membran eingesetzt, die  
25 allerdings in lateraler Richtung unterteilt ist in eine Aufbringzone und eine Reaktionszone. Kapillarkraftbedingt wandert die in der Aufbringzone aufgebraachte Probe in die Reaktionszone, in welcher zumindest ein erfindungsgemäßer Protein Typus immobilisiert ist. In der Aufbringzone werden keine erfindungsgemäße Proteine immobilisiert sein, es ist aber durchaus möglich, in der Aufbringzone andere Stoffe, beispielsweise Proteine, zu immobilisieren,

welche zu detektierende Antikörper nicht binden, dagegen aber in der Probe unerwünschte Stoffe binden und so abtrennen. Hierdurch wird die Zuverlässigkeit der Antikörper-Detektion beachtlich erhöht, da ggf. 5 unerwünschte Wechselwirkungen aufgrund anderer Blutbestandteile ausgeschaltet werden können. Die Reaktionszone kann eine Detektorsubstanz bereits enthalten, es kann aber auch vorgesehen sein, daß in der Detektorzone separat ein Auftrag von Detektorlösung 10 erfolgt.

Die Erzeugung einer Gesamtsequenz aus Antigen-Epitop-Sequenzen und zwischengeschalteten Brückenverbindungen, welche geladen sind, beispielsweise positiv 15 geladen sind, hat im übrigen auch besondere präparative Vorteile. Wenn ein solches Protein gentechnisch hergestellt wird durch Expression in einer Zelle, so ist zunächst eine Aufreinigung des Proteins aus einem Zellextrakt zweckmäßig. Die Ladungen der Brückenver- 20 bindungen erlauben nunmehr eine besonders effektive und einfache Reinigung auf sehr hohe Reinheitsgrade in einer Ionenaustauscherchromatographie, da der isoelektrische Punkt extrem hoch ist. Mit einer solchen Aufreinigung eines gentechnisch hergestellten 25 erfindungsgemäßen Proteins vor einer Immobilisierungsverfahrenstufe wird somit auch ein hinsichtlich gebundenen Proteins besonders reines Immobilisat erhalten. Dies erhöht letztendlich die Zuverlässigkeit eines Testsystems in beachtlichem Maße.

30

Definitionen

Der Begriff des HIV-Tests bezeichnet eine Nachweismethode zur Detektion von HIV-Antikörpern in Körperbestandteilen, insbesondere Körperflüssigkeiten. Körperflüssigkeiten sind beispielsweise Blut, Serum, Plasma, Speichel, Harn oder Liquor.

Der Begriff des Protein umfaßt im Rahmen der Erfindung Verbindungen, die natürliche oder nicht-natürliche Aminosäuresequenzen enthalten. Ein Protein kann synthetisiert oder jedenfalls hinsichtlich der Aminosäuresequenzen isoliert sein. Insofern umfaßt der Begriff des Proteins auch Peptide. Ein Protein muß nicht notwendigerweise ausschließlich aus Aminosäuren gebildet sein. Insbesondere die Brückenverbindung kann anders als aus Aminosäuren aufgebaut sein.

Als Antikörper ist bezeichnet eine durch einen Organismus natürlicherweise in Verfolg einer Infektion durch Immunreaktion gebildete Substanz, welche an den Erreger der Infektion oder Bestandteilen hiervon spezifisch zu binden vermag.

Als Antigen ist bezeichnet, eine Substanz, welche spezifisch an einen Antikörper zu binden vermag. Antigen und Antikörper sind einander zugeordnet nach Maßgabe des zu detektierenden Antikörpers bzw. der zu detektierenden Antikörper.

Eine Antigen-Epitop-Sequenz bezeichnet eine Aminosäuresequenz, gebildet aus natürlichen und/oder nicht natürlichen Aminosäuren, die einerseits chemisch bindungsfähig an einen zugeordneten Antikörper ist und andererseits eine solche Sekundär- und/oder

Tertiärstruktur aufweist, daß die rein chemische Bindung auch sterisch, i.e. nach dem "Schlüssel/Schloß-Prinzip", ermöglicht ist.

5 Der Begriff der Immobilisierung bezeichnet die Bindung einer Substanz aus der Flüssigphase an einer Feststoffoberfläche. Der Begriff der Bindung umfaßt die Chemisorption, die ionische Bindung, die kovalente Bindung sowie Zwischenformen solcher Bindungen.

10

Eine Brückenverbindung ist eine typischerweise oligomere Verbindung, deren Art der Monomere, deren Reihenfolge bzw. Sequenz und deren räumliche Ausrichtung, einschließlich eventueller interner oder externer Ver-  
 15 netzung, definiert ist. Insbesondere definiert sind Positionen der Enden der Brückenverbindung untereinander. Hierbei muß u.U. aber auch die jeweilig angeschlossene bzw. anzuschließende Antigen-Epitop-Sequenz sowie die gegenüberliegende Brückenverbindung  
 20 berücksichtigt werden, wenn die Anzahl der Freiheitsgrade der Brückenverbindung eine hinreichend eindeutige Definition der räumlichen Stellung der Enden nicht ohne weiteres zuläßt. Eine Brückenverbindung ist nicht notwendigerweise eine artifizielle Sequenz  
 25 bzw. eine artifiziell zwischen zwei Antigen-Epitop-Sequenzen eingefügte Sequenz. Es kann sich auch um eine native Sequenz zwischen zwei natürlicherweise beabstandeten Antigen-Epitop-Sequenzen handeln, wobei eine oder mehrere Aminosäuren auch ausgetauscht sein  
 30 können.

Eine Bindungsstelle bezeichnet im Rahmen der Terminologie der Patentansprüche eine reaktive Gruppe der



Brückenverbindung, mittels welcher eine Immobilisierung an der Festphase erreichbar ist.

Exponieren einer Antigen-Epitop-Sequenz bezeichnet die Einstellung der Sekundär- und/oder Tertiärstruktur der Sequenz so, daß eine Bindung an den Zielantikörper erfolgen kann. Insbesondere meint dies daher die Faltung im Bereich der Antigen-Epitop-Sequenz. Die Faltung kann auch unter Einbeziehung der Ausbildung von Disulfidbrücken erfolgen. Die Faltung führt in der Regel zur Ausbildung eines spezifischen Loops. Eine falsche Faltung führt zu einem falschen Loop. Eine falsche Faltung kann erfolgen, wenn die Enden einer Antigen-Epitop-Sequenz in ungeeigneter Weise räumlich zueinander stabilisiert sind.

Mit dem Merkmal der Brückenverbindung wird letztendlich erreicht, daß die Teile von zwei Brückenverbindungen, welche zwischen zwei benachbarten Bindungsstellen liegen, die Enden der zwischengeschalteten Antigen-Epitop-Sequenz so stabilisieren, daß eine gewünschte Faltung eingestellt wird. Wesentlich ist hierbei, daß die beiden Bindungsstellen geometrische Fixpunkte sind aufgrund der Bindung an der Festphase. Selbstverständlich können zwischen dem Ende einer Brückenverbindung und der daran angeschlossenen Antigen-Epitop-Sequenz nicht-funktionelle Sequenzen zwischengeschaltet sein, solange dies die vorstehend beschriebenen Zusammenhänge nicht berührt.

30

Eine Brückensequenz ist eine Brückenverbindung, welche aus mehreren natürlichen und/oder nicht-natürlichen Aminosäuren gebildet ist.

Der Ausdruck der verschiedenen Antikörper meint Antikörper unterschiedlichen Typus bzw. unterschiedlicher Struktur. Entsprechendes gilt im Zusammenhang mit 5 Genen, Stämmen, Subtypen und dergleichen.

Der Begriff der Spezifität bezeichnet die Fähigkeit einer Substanz, aus einer Anzahl gebotener Wechselwirkungsmöglichkeiten bzw. Reaktionsmöglichkeiten eine 10 ganz Bestimmte oder eine Gruppe von ganz Bestimmten wahrzunehmen. Ein für einen bestimmten Antikörper bzw. eine bestimmte Bindungssite eines Antikörpers spezifisches Antigen wird mit anderen, in einer Probe, ggf. nach Abtrennung von die Spezifität störenden Stoffen, 15 vorhandenen Antikörpern, die diese Bindungssite nicht aufweisen, keine Reaktion zeigen. Dagegen sind Antigene bzw. Sequenzen, welche eine Mehrzahl verschiedener Antikörper einer Probe binden, unspezifisch.

20 Der Begriff der Detektion bezeichnet die Erzeugung eines beliebigen direkt mittels der Sinne oder indirekt mittels physikalisch/chemischer Meßmethoden wahrnehmbaren Detektorsignals, welches seine kausale 25 Ursache in einem Antikörper/Antigen Bindungsereignis hat. Im einfachsten Fall handelt es sich um eine Farbreaktion. Detektionsmethoden für Antikörper/antigen Bindungsereignisse sind dem Fachmann in vielfältiger Weise bekannt und brauchen nicht näher erläutert zu 30 werden.

Eine Detektorlösung enthält eine oder mehrere Substanzen, die zur Erzeugung eines Detektorsignals nach

Maßgabe eines Bindungsereignisses Antikörper/Antigen  
in der Lage sind.

Der Ausdruck der Festphase bezeichnet einen Festkörper  
5 mit einer für Bindungsstellen bindungsfähigen  
Oberfläche.

Eine Spülverfahrensstufe umfaßt das Spülen eines  
erzeugten Immobilisats, i.e. einer Festphase mit daran  
10 gebundenem Protein, mit einer Lösung, welche schwach  
gebundene Proteine und/oder andere Substanzen von der  
Oberfläche der Festphase entfernt.

Eine Blockierungsverfahrensstufe umfaßt das Spülen  
15 eines Immobilisats mit einer Lösung, welche eine oder  
mehrere Substanzen enthält, die nicht in Bindung mit  
Protein gegangene Bereich der Oberfläche der Festphase  
absättigt, i.e. für die Bindung anderer Substanzen  
direkt an der Oberfläche der Festphase, blockiert.  
20

Ausführungsformen der Erfindung.

Im Folgenden werden lediglich beispielhaft nicht  
25 beschränkende Ausführungsformen der Erfindung näher  
erläutert.

Beispiel 1.

30

Im Folgenden werden Beispiele für artifizielle Brück-  
enverbindungen gegeben, welche im Rahmen eines

erfindungsgemäßen Proteins zum Nachweis von HIV Antikörpern einsetzbar sind.

Die Brückenverbindung 1 kann die folgende Sequenz  
5 aufweisen:

GKR--K-RK-KR--RRG

wobei "-" für eine oder mehrere beliebige Aminosäuren  
10 steht. Ein Beispiel für eine solche Brückenverbindung ist:

GKRAHKS RKHNYKRHIRRG

15 Die Brückenverbindung 2 kann die folgende Sequenz aufweisen:

G-KK-RR-KGK-RR-KK-G

20 wobei "-" für eine oder mehrere beliebige Aminosäuren steht. Ein Beispiel für eine solche Brückenverbindung ist:

GSKKARRIKGKMRRLLKKVG

25

Die Brückenverbindung 3 kann die folgende Sequenz aufweisen:

G-C-K-R-KRKXKRK-K--C-G

30

wobei "-" für eine oder mehrere beliebige Aminosäuren steht und wobei "X" für D oder E steht. Ein Beispiel für eine solche Brückenverbindung ist:

GVCIKHRYKRKDKRKHKVACIG

Die vorstehenden und nachfolgenden Buchstaben in Sequenzinformationen basieren auf dem Single Letter Code.

Beispiel 2.

10

Im Folgenden wird eine native Brückenverbindung angegeben, welche für ein erfindungsgemäßes Protein zum Nachweis von HIV Antikörpern geeignet ist.

15 GVA--K-KRR---REKRAVG

wobei "-" für eine beliebige Aminosäure steht. Diese Brückenverbindung stammt aus dem HIV-1 Envelope Gen.

20

Beispiel 3.

Im Folgenden werden erfindungsgemäße Proteine unter Verwendung von Brückenverbindungen u.a. aus den Beispielen 1 und/oder 2 näher beschrieben. Die Tabelle 1 gibt Möglichkeiten der Deletion und/oder Einfügung von Brückenverbindungen in Sequenzen mit Antigen-Epitopen wieder. Geeignete Sequenzen ID I bis ID VI mit Antigen-Epitopen sind in der Figur 1a-f wieder gegeben, wobei es sich um vollständige Sequenzen von HIV Proteinen handelt (wobei allerdings für die Erfindung nicht notwendigerweise mit vollständigen Sequenzen als Ausgangssequenzen gearbeitet werden muß).

## Beispiel 4.

In der Figur 2 sind Sequenzen Seq. ID A bis E dargestellt, wobei A bis D erfindungsgemäße Proteine sind, E jedoch ein nicht erfindungsgemäßes Protein ist. In den Sequenzen A bis D sind Modifikation so ausgeführt, daß zwischen den Antigen-Epitop Sequenzen geeignete Brückenverbindungen entstehen. Dagegen findet in E keine hinreichende Präsentation von Antigen-  
 10 Epitop Sequenzen statt. In der Figur 3a/b sind die Strukturen der Proteine C bis E dargestellt, wozu in einzelnen auf die folgenden Beispiele verwiesen wird.

## 15 Beispiel 5.

In diesem Beispiel wird die Herstellung eines erfindungsgemäßen Proteins beschrieben, nämlich von p31  
 $\Delta 100/40, 140/23, 163/14$   $\Omega 31/2, 100/3$

20

Lesart:

$\Delta X/Y$  (z.B.  $\Delta 100/76$ ) : Hinter der Aminosäure an Position 100 sind 76 Aminosäuren deletiert

$\Omega X/Y$  (z.B.  $\Omega 30/2$ ): Hinter der Aminosäure 30 ist die  
 25 Brückenverbindung 2 insertiert

## Teilschritt 1

Das Fragment 1 wird mittels der PCR-Technologie gewonnen.  
 30 Als Primer dienen für die Amplifikation die Oligonukleotide 5'-ATATGGCATATGTTTTAGATGGAATAGATAAGG-CCC-3' und 5'-TATAGGGCCCAGGTGGCAGGTAAAA-3', als Template wird das HIV-pol Gen verwendet. Die PCR-Reaktion wird nach

üblichem Protokoll durchgeführt. Das gewünschte PCR-Produkt (ca.110bp) wird isoliert und einer Restriktion mit ApaI und NdeI unterworfen.

5 Fragment 1 (Epitope 1, PCR)

10  
 atatgg  
 .....TTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGATGAACATGAGAAATATCACAGTAATTGGAGA  
 M F L D G I D K A Q D E H E K Y H S N W R  
 .....AAAATCTACCTTATCTATTCCGGGTTCTACTTGTACTCTTTATAGTGTCAATTAACCTCT  
 GCAATGGCTAGTGATTTTAACCTGCCACCT.....  
 A M A S D F N L F F  
 CGTTACCGATCACTAAAATTGGACGGTGA.....  
 AATTCGGACGGTGAATTCGGGatat  
 AatI

## Teilschritt 2

15

Zwei Oligonukleotide

(5' -CAAAAAGGCCCGTCGCATCAAGGGCAAAATGCGACGGGTGAAGAAAG-3' und

5' -CCGGCTTTCTTCACCCGTCGCATTTTGCCCTTGATGCGACGGGCCTTTTGGGCC

-3') werden bei 100°C kurz denaturiert, im linear  
20 abfallenden Temperaturgradienten miteinander hybridisiert  
und das Doppelstrangprodukt anschließend isoliert.

Fragment 2 (Brückenverbindung 2, synthetisch)

25

Apri  
 CAAARAGGCGCGCTTGCATCAAGGGCGAATCGGACGGGTGAAGAAG  
 G P K K A R R I K G K M R R V K K A G  
 CCGGGTTTTTCCGGGCAGCGTAGTTCCCGTTTTACGCTGCCACTTCTTTGGGC  
 NgpMIV

30 Teilschritt 3

Das Fragment 3 wird mittels der PCR-Technologie gewonnen.  
Als Primer dienen für die Amplifikation die

Oligonukleotide 5'-TAATTTGCCGGCGTAGTAGCAAAAGAAATAGTAG-3' und 5'-TATAGCATGCTCCATATGCTGTTTCCTGCCCTGT-3', als Template wird das HIV-pol Gen verwendet. Die PCR-Reaktion wird nach bekanntem Protokoll durchgeführt. Das gewünschte 5 PCR-Produkt (233bp) wird einer Restriktion mit NgoMIV und SphI unterworfen und anschließend isoliert.

Fragment 3 (Epitop 2, PCR) (233bp)

10 NgoMIV  
 GTAGTAGCAAAAGAAATAGTAGCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAGGAGAAGCCATG  
 A G V V A K E I V A S C D K C Q L K G E A M  
 CATGGACAAGTAGACTGTAGTCCAGGAATATGGCAACTAGATTGTACACATTTAGAAGGA  
 H G Q V D C S P G I W Q L D C T H L E G  
 15 AAAGTTATCCTGGTAGCAGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTTATTCCA  
 K V I L V A V H V A S G Y I E A E V I F  
 GCAGAAACAGGGCAGGAAACAGCATAT  
 A E T G Q E T A Y G A C  
 CGTCTTTGTCCCGTCCTTTGTCGTATA  
 TCTCTGGTACTTTCTTGTATAGCTCTCTAGGAGAT  
 SphI

20 Teilschritt 4

Zwei Oligonukleotide

(5'-CATGCATCAAACACCGCTACAAGCGACGCGATCGTCGGAAGCATAAAGTGGCCT  
 25 GC-3' und  
 5'-CTAGGCAGGCCACTTTATGCTTCCGACGATCGCGTCGCTTGTAGCGGTGTTTGAT  
 G-3') werden bei 100°C kurz denaturiert, im linear  
 abfallenden Temperaturgradienten miteinander hybridisiert  
 und das Doppelstrangprodukt isoliert.

30 Fragment 4 (Brückenverbindung 3, synthetisch)

SphI  
 CATGCATCAAACACCGCTACAAGCGACGCGATCGTCGGAAGCATAAAGTGGCCTCC  
 A C I K H R Y K R R D R R K H K V A C I G  
 GTAGTTTGTGGCGATGTTTGGCTGCGTAGCAGCCTTCGTATTTCAACCGGACGGATC



AvrII

## Teilschritt 5

- 5 Das Fragment 5 wird mittels der PCR-Technologie gewonnen. Als Primer dienen für die Amplifikation die Oligonukleotide 5'- ATTATCCTAGGTCAAATGGCAGTATTCATCCAC-3' und 5'-TATAGGATCCTAATCCTCATCCTGTCTACTTGC-3', als Template wird das HIV-pol Gen verwendet. Die PCR-Reaktion wird nach
- 10 bekanntem Protokoll durchgeführt. Das gewünschte PCR-Produkt (360bp) wird einer Restriktion mit AvrII und BamHI unterworfen und anschließend isoliert.

## Fragment 5 (Epitop 3, PCR)

15

AvrII

5'-ATTATCCTAGGTCAAATGGCAGTATTCATCCAC-3'

CAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGGGGGGATTGGGGGGTACAGTGCA  
C I G Q M A V F I H N F K P K G G I G G Y S A

GGGGAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATACAACTAAAGAATTACAAAAACAA  
G E R I V D I I A T D I Q T K E L Q K Q

20

ATTACAAAATTCAAATTTTCGGGTTTATTACAGGGACAGCAGAAATCCACTTTGGAAA  
I T K I Q N F R V Y Y R D S R N P L W K

GGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGGGGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGAC  
G F A K L L W K G E G A V V I Q D N S D

ATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAGATCATTAGGGATTATGGAAAACAGATGGCA  
I K V V P P P K A K I I R D Y G K Q M A

25

GGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGGATGAGGATTAG  
G D D C V A S E Q D E D \*  
CCACTACTAACACACCGTTCATCTGTCTACTCCTAATC

3'-TATAGGATCCTAATCCTCATCCTGTCTACTTGC-5'

BamHI

## 30 Teilschritt 6

Ein geeigneter Expressionsvektor wird mit NdeI und BamHI geschnitten und das Vektorfragment isoliert.

## Teilschritt 7

Das aufgereinigte Vektorfragment und die jeweils  
5 isolierten Teilfragmente werden mit Hilfe von  
Ligationsreaktionen miteinander verknüpft.

## Teilschritt 8

10 Geeignete E.coli Zellen werden mit den Ligationsprodukten  
transformiert und selektioniert.

## Teilschritt 9

15 Aus erhaltenen Kolonien wird die Plasmid-DNA isoliert und  
auf Vorhandensein, Anordnung und Orientierung der  
Teilsequenzen mit den Enzymen NdeI, ApaI, NgoMIV, SphI,  
AvrII und BamHI in verschiedenen Kombinationen geprüft.  
Plasmid-DNA mit positivem Ergebnis wird zur Bestätigung  
20 sequenziert.

p31 nativ

p31Δ100/40,140/23,163/14 Ω31/2,100/3

25	Frg. 1	Frg.2	Frg.3	Frg.4	Frg.5
	NdeI	ApaI	NgoMIV	SphI	AvrII BamHI

Gesamtnukleotidsequenz:

CATATGTTTTAGATGGAATAGATAAGGCCCAAGATGAACATGAGAAATATCACAGTA  
30 ATTGGAGAGCAATGGCTAGTGATTTTAACCTGCCACCTGGGCCCAAAAAGGCCCGTCG  
CATCAAGGGCAAAATGCGACGGGTGAAGAAAGCCGGCGTAGTAGCAAAAGAAATAGTA  
GCCAGCTGTGATAAATGTCAGCTAAAAGGAGAAGCCATGCATGGACAAGTAGACTGTA  
GTCCAGGAATATGGCAACTAGATTGTACACATTTAGAAGGAAAAGTTATCCTGGTAGC

AGTTCATGTAGCCAGTGGATATATAGAAGCAGAAGTTATTCCAGCAGAAACAGGGCAG  
 GAAACAGCATATGGAGCATGCATCAAACACCGCTACAAGCGACGCGATCGTCGGAAGC  
 ATAAAGTGGCCTGCCTAGGTCAAATGGCAGTATTCATCCACAATTTTAAAAGAAAAGG  
 GGGGATTGGGGGGTACAGTGCAGGGGAAAGAATAGTAGACATAATAGCAACAGACATA  
 5 CAAACTAAAGAATTACAAAAACAAATTACAAAAATTCAAATTTTCGGGTTTATTACA  
 GGGACAGCAGAAATCCACTTTGGAAAGGACCAGCAAAGCTCCTCTGGAAAGGTGAAGG  
 GGCAGTAGTAATACAAGATAATAGTGACATAAAAGTAGTGCCAAGAAGAAAAGCAAAG  
 ATCATTAGGGATTATGGAAAACAGATGGCAGGTGATGATTGTGTGGCAAGTAGACAGG  
 ATGAGGATTAGGATCC

10

Gesamtaminosäuresequenz:

MFLDGIDKAQDEHEKYHSNWRAMASDFNLPPGPKKARRIKGKMRVKKAGVVAKEIVA  
 SCDKCQLKGEAMHGQVDCSPGIWQLDCTHLEGKVLVAVHVASGYIEAEVIPAETGQE  
 15 TAYGACIKHRYKRRDRRKHKVACIGOMAVFIHNFRRKGGIGGYSAGERIVDI IATDIQ  
 TKELQKQITKIQNFRVYYRDSRNPLWKGPALLWKGEAVVIQDNSDIKVVPKKAKI  
 IRDYGKQ MAGDDCVASRQDED\*

Die Expression eines erfindungsgemäßen Proteins wird wie  
 20 folgt durchgeführt. Nachdem die kodierende Nukleinsäure  
 für das zu exprimierende Protein hergestellt und über  
 Restriktionsschnittstellen in einen handelsüblichen Vektor  
 eingebaut wurde, erfolgt eine Transformation des Plasmids  
 in eine handelsübliche *E. coli*-Zelle. Nach einer  
 25 Inokulierung eines Mediums (z.B. LB-Medium) mit dem  
 Transformationsansatz erfolgt die Anzucht der Zellkultur  
 durch Inkubation bei einer optimalen Temperatur (z.B.  
 37°C). Die Protein-Expression wird durch eine Zugabe von  
 Isopropyl  $\beta$ -D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert und  
 30 durch eine Fortführung der Inkubation erreicht. Nach dem  
 Ernten der *E. coli*-Zellen durch Zentrifugation wird eine  
 Zelllyse mit einem Lysispuffer (z.B. einem  
 Guanidinhydrochloridhaltigen Puffer) durchgeführt.

Die Reinigung des Proteins kann über herkömmliche Chromatographiemethoden (z.B. Ionenaustauscherchromatographie und Gelchromatographie) erfolgen, wobei der durch Einfügen positiv geladener Sequenzen erhöhte isoelektrische Punkt der Proteine vorteilhaft benutzt werden kann, die Proteine über Kationenaustauscherchromatographie stark anzureichern. Üblicherweise werden die chromatographischen Trennungen mit Hilfe von Chromatographiesäulen, in die das Material eingebracht wird, durchgeführt. Falls die Proteine mit einem „tag“ (z.B. einem N- oder C-terminalen His6-Peptid, einem „flag-tag“ oder myc-Epitop) versehen wurden, können sie durch Verwendung einer Affinitätschromatographie gereinigt werden, wobei das jeweilige Protein über den „tag“ an das entsprechende Affinitätschromatographiematerial (z.B. für His6-tag an Ni-NTA-Material) gebunden wird. Nachdem das Material mit entsprechenden Waschpuffern mehrmals gewaschen wurde, wird das gewünschte Protein mit Hilfe von mindestens einem Elutionspuffer (z.B. durch einen Puffer mit deutlich erhöhten oder erniedrigten pH-Wert) von dem Material abgetrennt. Abschließend werden die Eluate noch mehreren Dialyseschritten unterzogen, um die Weiterverwendung des Proteins zu erlauben.

25

#### Beispiel 6.

In diesem Beispiel wird die Herstellung eines erfindungsgemäßen Immobilisats beschrieben. Das gereinigte Protein wird in geeigneter Weise mit einer wäßrigen Lösung von 100 mM NaCl und 0,4 - 0,8 % SDS verdünnt. Von dieser Lösung werden mit Hilfe eines BioDot-Gerätes (Cambridge, England) 0,5 µl auf eine

Nitrozellulosemembran aufgebracht, so daß sich auf einem Fleck mit 3 - 4 mm Durchmesser 250 ng Protein befinden. Die Membran wird nach Aufbringen des Proteins für mindestens eine Stunde getrocknet, bevor die

5 Nachweisreaktion durchgeführt wird.

Es wird ein Immobilisat erhalten, bei welchem die Anordnung und Faltung des Proteins in einer Weise erfolgt ist, die schematisch in der Figur 3a dargestellt ist. Die

10 Epitope sind durch eine positiv geladene Peptidsequenz getrennt, was eine Anheftung an die Membran und eine richtige Faltung der Epitope (unterstrichene Sequenzbereiche) erlaubt.

15 Zu der in Fig. 3a dargestellten Faltung mag angemerkt werden, daß möglicherweise nicht alle Proteinmoleküle, die auf die feste Phase aufgebracht werden, sich in der skizzierten Weise falten werden. Ein Teil der Moleküle kann, verursacht durch die Lyse der Zellen und die

20 anschließende Reinigungsprozedur in ungeordnetem (denaturiertem) Faltungszustand vorliegen. Für den Zweck der Erfindung ist aber ausreichend, wenn bei einem erfindungsgemäß konstruierten Protein die Wahrscheinlichkeit einer für die Bindung von Antikörpern geeigneten

25 Faltung, induziert durch die durch den Einbau der Brückenverbindungen ermöglichte optimale Anheftung auf der festen Phase, gegenüber einem keine Brückenverbindungen enthaltenden Protein deutlich erhöht ist. Durch diese erhöhte Wahrscheinlichkeit der "richtigen" Faltung wird

30 die Möglichkeit der Bindung der Antikörper insgesamt stark verbessert und damit die Erhöhung der Sensitivität des gesamten Nachweisverfahrens gewährleistet.

## Beispiel 7.

Ein Immobilisat aus Beispiel 6 wurde mit Seren aus  
5 diversen HIV positiven Patienten beschickt und die  
Reaktion wurde mittels einer Detektorlösung geprüft.  
Es zeigte sich in allen Fällen eine für die Bindung  
Antikörper/Antigen spezifische Farbreaktion. Falsch  
negative Ergebnisse wurden nicht erhalten. Versuche  
10 mit Seren von HIV negativen Personen ergaben, daß  
keine einzige falsch positive Anzeige erhalten wird.

## Beispiel 8.

15

In diesem Vergleichsbeispiel wurde mit einem Protein  
env 4 (ID E) ein Immobilisat entsprechend der Ver-  
fahrensweise nach Beispiel 6 hergestellt. Der Unter-  
schied besteht ausweislich einer vergleichenden  
20 Betrachtung der Figuren 3a und 3c jedoch darin, daß  
zwischen den linksseitig liegenden Epitopen keine  
positiv geladene Brückenverbindung eingerichtet ist.  
Man erkennt weiterhin, daß dadurch die beiden link-  
sseitigen Epitope nahe beinander liegen und so gefaltet  
25 werden - unter Ausbildung von die Antigenizität zer-  
störenden Disulfidbrücken -, daß eine Bindung eines  
Antikörpers nicht erfolgen kann.

Mit gleicher Proteinmenge, wie in Beispiel 7 wurden  
30 wiederum Tests mit Seren diverser HIV positiver Pa-  
tienten durchgeführt. Durchweg wurde praktisch keine  
Reaktion angezeigt, wurden also regelmäßig falsch  
negative Ergebnisse erhalten.

## Beispiel 9.

5 In diesem Beispiel wird anhand der Figur 3b ein erfindungsgemäßes Protein (ID D) bzw. Immobilisat mit repetitiven Sequenzelementen aus verschiedenen HIV-Subtypen schematisch dargestellt (auch gleiche sind möglich). Dieses erfindungsgemäße Protein ist dabei  
10 nur aus V3 Loops verschiedener HIV Subtypen gebildet, die durch ein positiv geladenes Sequenzelement aus gp120 getrennt sind.

## 15 Beispiel 10.

Ein erfindungsgemäßer Schnelltest ist wie folgt aufgebaut. Ein Immobilisat gemäß Beispiel 6 wird in einem Kunststoffgehäuse unter einer Zugriffsöffnung so positioniert und fixiert, daß zumindest ein Teilbereich  
20 des Immobilisats dem Zugriff unterliegt. Das Immobilisat ist dabei mit einer saugfähigen Unterlage, beispielsweise Watte, unterfüttert. Zu dem Schnelltest gehört eine separat abgepackte Detektorlösung.

25

Der Nachweis von an das Antigen gebundenen Antikörpern kann mit Hilfe einer Detektionslösung erfolgen, die ein Konjugat aus Protein A mit kolloidalem Gold enthält. Die Verwendung von solchen Konjugaten in  
30 immunologischen Testverfahren ist allgemein bekannt und in der Literatur beschrieben. Dieses Konjugat kann beispielsweise wie in US 5,541,059 beschrieben hergestellt werden durch Mischen von 100 ml einer

kolloidalen Gold-Lösung (kommerziell erhältlich) mit 100 ml einer 0.006 mg/ml enthaltenden Lösung von Protein A (Protein A ist als sowohl in lyophilisierter Form als auch als Lösung kommerziell erhältlich).

5 Alternativ kann ein Protein A-Gold-Konjugat auch kommerziell erworben werden.

Die Bindung des Konjugats an die gebundenen Antikörper kann visuell detektiert werden. Im vorliegenden Beispiel  
10 ergibt sich bei Vorhandensein von gebundenen Antikörpern ein rötlicher Fleck.

Alternativ zu den Konjugaten mit kolloidalem Gold kann auch eine Farbstoffsuspension verwendet werden, wobei  
15 Protein A an einen wasserunlöslichen Farbstoff adsorbiert wird.

Ein Schnelltest wird wie folgt durchgeführt. Einem Probanden wird durch Nadelstich eine kleine blutende  
20 Wunde zugefügt. Der entstehende Blutropfen wird in einer kleinen Kapillaren aufgenommen. Die Kapillare mit dem Blut wird dann in einem Behälter mit einem geeigneten Lösungsmittel, beispielsweise physiologische Kochsalzlösung, zusammengegeben und solange geschüt-  
25 telt, bis Blut und Lösungsmittel sich vermischt haben. Der Inhalt des Behälters wird dann über die Zugriffsöffnung auf das Immobilisat gegeben. Sodann wird die Detektorlösung aufgegeben und visuell beobachtet, ob eine Verfärbung des durch die Zugriffsöffnung  
30 sichtbaren Immobilisats erfolgt. Verfärbung bedeutet, daß HIV-Antikörper in dem Blut des Probanden vorliegen. Tritt keine Verfärbung ein, so ist das Ergebnis dagegen negativ.



## Patentansprüche:

s.:

1. Protein mit mehreren Antigen-Epitop-Sequenzen für  
5 Antikörper, wobei das Protein an einer Festphase  
über zumindest eine Bindungsstelle immobilisiert  
ist, und wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen über  
Brückenverbindungen mit der Maßgabe beabstandet  
sind, daß nach Bindung der Bindungsstelle an der  
10 Festphase die Antigen-Epitop-Sequenzen für eine  
Bindung der zugeordneten Antikörper aus der flüssi-  
gen Phase exponiert sind.
- 15 2. Protein nach Anspruch 1, wobei eine Brückenver-  
bindung durch Insertion von Brückensequenzen  
zwischen zwei Antigen-Epitop-Sequenzen und/oder  
Deletion einer Teilsequenz zwischen zwei in einer  
Gesamtsequenz angeordneten Antigen-Epitop-Sequenzen  
20 gebildet sind.
3. Protein nach Anspruch 1, wobei die Brückenver-  
bindung durch Fusion einer Brückensequenz mit zwei  
25 Antigen-Epitop-Sequenzen gebildet ist.
4. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 3, wobei die  
Brückenverbindung positiv geladene Bindungsstellen  
30 zur Bindung an eine negativ geladene Festphase,  
vorzugsweise eine Membran, aufweist.

5. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen verschiedene Antikörper binden.

5

6. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen repetitive Sequenzelemente aus gleichen oder verschiedenen HIV Subtypen sind.

10

7. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen Sequenzen aus verschiedenen HIV Genen und/oder Stämmen und/oder Subtypen sind.

15

8. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 5, wobei die Antigen-Epitop-Sequenzen Sequenzen aus einem einzigen HIV Subtyp sind.

20

9. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 8, wobei die Brückenverbindung ein Sequenzelement aus gp120 ist.

25

10. Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 9, wobei Teilsequenzen, welche in Körperflüssigkeiten enthaltene Antikörper unspezifisch binden, deletiert sind.

30

11. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung eines Immobilisats zur

Detektion von Antikörpern, wobei zunächst das Protein in Lösung hergestellt wird, wobei dann das Protein über zumindest eine Bindungsstelle an eine Festphase gebunden wird und wobei optional die Festphase mit dem daran gebundenen Protein zumindest einer Spülverfahrensstufe und/oder Blockierungsverfahrensstufe unterworfen wird.

10 12. Verwendung eines Proteins nach einem der Ansprüche 1 bis 10 zur Herstellung eines HIV Tests, wobei ein Immobilisat nach Anspruch 11 hergestellt wird, wobei dieses Immobilisat in ein Gehäuse eingesetzt wird und wobei eine Detektorlösung entweder in einer Reaktionszone des Immobilisats eingebracht ist oder separat zur Aufbringung auf das Immobilisat beigelegt wird.

20 13. Polynukleotid, insbesondere cDNA, codierend für ein Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

25 14. Expressionsvektor, vorzugsweise Plasmid, enthaltend eine Polynukleotid Sequenz kodierend für ein Protein nach einem der Ansprüche 1 bis 10.

30 15. Zelle, welche mittels eines Expressionsvektors nach Anspruch 14 transformiert ist.

16. Verfahren zur Herstellung eines Proteins nach  
einem der Ansprüche 1 bis 10, wobei die Antigen-  
Epitop-Sequenzen und die Brückensequenzen aus-  
gewählt werden und die Ordnung der Aneinanderrei-  
5 hung definiert wird, wobei für die  
Antigen-Epitop-Sequenzen und die Brückensequenzen  
codierende DNA in einen Expressionsvektor anein-  
ander in der definierten Weise anschließend in-  
sertiert wird, wobei eine Zelle, vorzugsweise E.  
10 coli, mittels des Expressionsvektors transformiert  
wird, wobei transformierte Zellen selektiert und  
kultiviert werden, und wobei das von den selek-  
tierten Zellen exprimierte Protein isoliert wird.

15

20

25

30

### Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Protein mit mehreren  
Antigen-Epitop-Sequenzen für Antikörper, wobei das  
5 Protein an einer Festphase über zumindest eine  
Bindungsstelle immobilisiert ist, und wobei die  
Antigen-Epitop-Sequenzen über Brückenverbindungen mit  
der Maßgabe beabstandet sind, daß nach Bindung der  
Bindungsstelle an der Festphase die Antigen-Epitop-  
10 Sequenzen für eine Bindung der zugeordneten Antikörper  
aus der flüssigen Phase exponiert sind. - Fig. 2

15

20

25

30

### 3. Permutationstabelle

Protein	Seq ID	Mögliche Deletionen (Δ) (AS-Position/AS-Anzahl)	Einfügestellen (Ω) von den Inserts (AS-Position/Seq ID)	
			Brückenvbd. 1,2,3 (Seq ID 1-3)	native Brückenvbd.1 (Seq ID 4)
gag (500 AS)	I.	Δ 1/131	Ω 132(1/3)	Ω 249(4)
		Δ 159/150	Ω 249(2/3)	Ω 323(4)
		Δ 363/14	Ω 323(1/2/3)	Ω 450(4)
		Δ 450/50	Ω 450(1/2/3)	
pol 1 (561 AS)	II.	Δ 1/60	Ω 61(1/2/3)	Ω 61(4)
		Δ 398/29	Ω 228(1/2/3)	Ω 284(4)
		Δ 441/120	Ω 284(1/2/3)	Ω 436(4)
			Ω 436(1/2/3)	Ω 535(4)
pol 2 (289 AS)	III.	Δ 100/40	Ω 31(1/2)	
		Δ 163/14	Ω 100(1/2/3)	Ω 140(4)
			Ω 140(2/3)	Ω 177(4)
			Ω 177(1/3)	
env 1 (491 AS)	IV.	Δ 1/4	Ω 44(1/2/3)	Ω 3(14/17/29-36)
		Δ 54/18	Ω 87(1/2/3)	Ω 75(13-20/24/27/31)
		Δ 136/1	Ω 160(1/2/3)	Ω 136(13-36)
		Δ 230/20	Ω 253(1/2/3)	Ω 137(13-25/35)
env 2 (392 AS)	V.	Δ 489/2	Ω 417(1/2/3)	Ω 213(13-18/23-36)
		Δ 1/46		Ω 392(13-36)
		Δ 142/13		Ω 452(19/21/34)
		Δ 210/5		Ω 8(5-8/9/11/12)
env 3 (360 AS)	VI.	Δ 240/23	Ω 8(1/2)	Ω 45(9-11)
		Δ 344/48	Ω 112(1/2/3)	Ω 161(5/7/8)
			Ω 215(1/2/3)	Ω 202(6/7)
			Ω 344(1/3)	Ω 214(6-8)
		Δ 2/38	Ω 69(1/2/3)	Ω 215(9-12)
		Δ 257/103	Ω 176(1/2/3)	Ω 286(10/11)
			Ω 253(1/2/3)	Ω 344(9-12)

2. Aminosäuresequenzen (Single Letter Aminosäurecode) der Insertionen

Seq ID	Aminosäuresequenz	Seq ID	Aminosäuresequenz
1	GKR--K-RK-KR--RRG	20	IRQGIHIGPGRAFFAAW
2	G-KK-RR-KGK-RR-KK-G	21	DVQEMRIGPMAWYSMG
3	G-C-K-R-KRRXRRK-K--C-G	22	ICTRRGIRMGPGQVVYATCT
4	GVA--K-KRR--REKRAVG	23	TIVQIKIIGPLAVYSMYG
5	WQLQQLNLNMGCRGKLCYTN	24	TRKSVRIGPGQAFYAT
6	WIQNQQLNLNMGCKGRVLCYTN	25	GHTRKSIRIGPGQTFYAT
7	WLQNQQILNLNMGCKGRVLCYTN	26	NTRQSTHIGPGALYTTKIE
8	WLQSQQLLSNMGCRGKLVLCYTN	27	TRKSIHLGPGQAFYATGD
9	AIERYLDQARLNSWGCTFRQVCH	28	YQTRKSIRIGPGQAFYATGD
10	AMEKYLRDQAIVNSWGCAFRQVCY	29	TVQEIRIGPMAWYSMGNV
11	AMEKYLKDQARLNSWGCAFRQVCH	30	TRISHTIGPGRVFYRT
12	AIEKYLKHQAQLNAWGCAFRQVCH	31	TRKGIHMGPGQVLYATKP
13	TRKSIHIGPGQAFYATGD	32	HTRKSIHIGPGRAFYATS
14	TRRSISFGIGPGQALYTT	33	TRKSIHIGPGRAFYTTSMQ
15	TRQRTPIGLGQALYTTGQF	34	QTRTSITIGPGQVFYRTE
16	RTVQEIRIGPMAWYSMGA	35	GTRKSVRIGPGQTFYATG
17	TMKRTSIHIGPGQTFYAT	36	TRKGIHIGPGRAFYATG
18	TRRGIPLGPGRAWYATL	37	AVGIGINCTRPNNN
19	DSTRESMRIGPGQAFYATG	38	GDIIGDIRQAHCNIGTPT

Legende: X ≡ D oder E  
 "-" ≡ beliebige Aminosäure

Patentanhang

Fig. 1

1. Aminosäuresequenzen (Single Letter Aminosäurecode)

Seq ID I.: gag (500 AS)

M<sup>-</sup>GARASVLSGGLDRWEKIRLRPGGKKYK<sup>1</sup>KLHIVASRELERFAVNPGLLETSEGCRIQLQLPSLQ<sup>2</sup>TGSEELRSLYNTVATLYCVHQRIEIKDTK  
EALDKIEEEQNKS<sup>3</sup>KKKAQQAADTGHSNQVSQNY<sup>4</sup>+1/3+<sup>5</sup>PIVQNIQGMVHQAISPRTLNAWVKV<sup>6</sup>-<sup>7</sup>PEEKAFSPEVIPMF<sup>8</sup>SALSEGATPQDLN<sup>9</sup>TML  
NTVGGHQAAMQLKETINEEAAEWD<sup>10</sup>RVHPVHAGPIAPGQMRPRGSDIAGTSTLQEIQ<sup>11</sup>GW+2/3+<sup>12</sup>MTNNPPIPVGEIYKR<sup>13</sup>WII<sup>14</sup>LGLNKIVRMYSPTS<sup>15</sup>I  
LDIRQGPKEPFRDYVDRFYK<sup>16</sup>TLRAEQ<sup>17</sup>A<sup>18</sup>-SQEVKNWMTETLLV<sup>19</sup>+1/2/3+<sup>20</sup>QANANPDCKTILKALGPAATLEEMMTACQGVGPGH<sup>21</sup>KARVL<sup>22</sup>-<sup>23</sup>AEAM<sup>24</sup>SQV  
TNSATIM<sup>25</sup>-<sup>26</sup>MORGNFRNQKI<sup>27</sup>VKCFNCGKEGHTARNCRAPRKKGCWCKGEGHQM<sup>28</sup>KDCTERQANFLGKIWPSYKGRPGN<sup>29</sup>FLQ<sup>30</sup>+1/2/3+<sup>31</sup>SRPEPTAP  
PEESFRSGVETTPPQKQEPIDKELYPLTSLRSLFGNDPSSQ<sup>32</sup>

Seq ID II.: pol 1 (561 AS)

M<sup>-</sup>PISPIETVPVKLKPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPV<sup>1</sup>+1/2/3+<sup>2</sup>FAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKR<sup>3</sup>TQDFW  
EVQLGIPHAGLKKKSVTVLVDGDAYFSVPLDEDFRKYTAFTIP<sup>4</sup>SINNETPGIRYQYNVLPQGWKGS<sup>5</sup>PAIFQSSMTKILEPFRKQNP<sup>6</sup>NIVYQYMDDL  
YVGS<sup>7</sup>DLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEPP<sup>8</sup>+1/2/3+<sup>9</sup>LWMGYELHPDKWTVQPIVLPEKDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPG<sup>10</sup>IKVRQL  
CKLL<sup>11</sup>+1/2/3+<sup>12</sup>RGTKALTEV<sup>13</sup>IPLT<sup>14</sup>EEAELELAENREILKEPVHG<sup>15</sup>VYDPSKDLIAEIQKQGQGW<sup>16</sup>TYQIYQEPFKNLKTGKYARMRG<sup>17</sup>AHTNDVKQLTE  
AVQKITTESIVIGKTPKFKLPIQKET<sup>18</sup>-WETWTEYQ<sup>19</sup>QATWIP<sup>20</sup>EW<sup>21</sup>EFVNT<sup>22</sup>PPLVKLW<sup>23</sup>-YQLEKEPIV<sup>24</sup>+1/2/3+<sup>25</sup>GAET<sup>26</sup>F<sup>27</sup>YVDGAANRET<sup>28</sup>KL<sup>29</sup>GKAGYVT  
NRGRQKVVT<sup>30</sup>LTDTT<sup>31</sup>NQKTELQAIY<sup>32</sup>LALQDSGLEVNIVTDSQYALGIIQAQPDQSESELV<sup>33</sup>NQ<sup>34</sup>IEQLIKKEKV<sup>35</sup>YL<sup>36</sup>A<sup>37</sup>+1/2/3+<sup>38</sup>WVPAHKGIGGNEQV<sup>39</sup>DKL  
VSAGIRKVL<sup>40</sup>

Seq ID III.: pol 2 (289 AS)

MFLDGIDKAQDEHEKYHSNWRAMASDFNLPP<sup>1</sup>+1/2/3+<sup>2</sup>VVAKEIVASCDKCKQLKGEAMHGQVDCSPGIWQLDCTHLE<sup>3</sup>GKVILVAVHVASGYIEAEVIPA  
ETGQETAY<sup>4</sup>+1/2/3+<sup>5</sup>FLLKLAGRWPVKTIHTDNGSNFTSATVKAACWAGIKQEF<sup>6</sup>+1/2/3+<sup>7</sup>GIPYNPQSQGVVESMNKELKKII<sup>8</sup>-<sup>9</sup>GQVRDQAEH  
LKTAV<sup>10</sup>+1/2/3+<sup>11</sup>QMAVFIHNFRKKGIGGYSAGERIVDIIATDIQTKELQKITKI<sup>12</sup>QNF<sup>13</sup>RVYRDSRNP<sup>14</sup>LWKGP<sup>15</sup>AKLLWKGE<sup>16</sup>GA<sup>17</sup>V<sup>18</sup>IQD<sup>19</sup>NSDI<sup>20</sup>KV<sup>21</sup>VP  
RKAKIIRDYGKQ<sup>22</sup>MAGDDCVASRQDE



Fig. 1

Seq ID IV.: env 1 (491 AS)

M-DG-+14/17/29-36+-SH-G-TEKLWVTYYGVVWKEATTLFCASDAKAY-DTEVHNV+1/2/3+WATHACVPTD-PNPQEVVLNVVTENFNMW  
-KND+13-20/24/27/31+MVEQMHEDIISL+1/2/3+WDQSLKPCVKLTPLCVSLKE-CTDLKNDTNTNSSSGRMIMEKEIKNCS-F+13-36+P+  
13-25/35+NISTSIRGKVQKEYAFFYKLDII+1/2/3+PIDNDTTSYKLTSCNTSVITQACPKVSFEPIPIHYCAPAGFAILKCNNKTENG+13-18  
/23-36+GPCTNVSTVQCTHGIR-PVSTQLLNGSLAEEVVI-RSV+1/2/3+NFTDNAKTIIVQLNTSVEINCTRPNNNTRKRIRIQRGPGRAFVT  
IGKIGNMRQAH-CNISRAKWNNTLKQIASKLREQFGNNKTIIFKQSSGGDPEIVTHSFNCGGEFFYCNCSTQLENSTWFENSTWSTEGSNNTGSD-LQ+1  
3-36+TITLPCRKQIINMWQVGVKAMYAP+1/2/3+PISQIRCSSNITGLLLTRDGGNSNNESEIFRPGG+19/21/34+GDMRDNWRSELYKYKV  
KIEPLGVAPTAKRRRVVQRE-KR-

Seq ID V.: env 2 (392 AS)

M-GSDMRDN+1/2/5-8/9/11/12+WRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKRRRVVQREKRAVGIGS-+9-11+-ALFLGLGAAGSTMGAASMTLTVQA-  
ROLLSGIVQQNNLLRAIEAQOHLQLQARIL+1/2/3+AVERYLKDQQLGIWCGSKLICITAVPWN-ASWSNKSLEQIWN-N-MTWME  
-+5/7/8+WDREINNYTSLIHSLEESONQOKEQELLELDKWASLWN+6/7+WFNITNWL-EFNN+6-8+W-+1/2/3/9-12+-WYIKLFIMIVGG  
LVGLRIVEAVLSI-VNVRQGYSPLSFQTHLPIPRGP-DRPEGIEEGGERDRDRSIRLVN+10/11+-GSLALIWDLRLSLCLFSYHRLRDLILLIVT  
RIVELLGRRGWEALKYWNLLQWSQELK+1/3/9-12+-NSAVSLLNATAIAVAEGTDRVIEVVQACRAIRHIPRIRQGLERILL-

Seq ID VI.: env 3 (360 AS)

MM-SSAHGRHTRGVFLGFLGFLATAGSAMGAASLTVSAQS-RTLLAGIVQQQQQLLDVVKRQQELLRLTV+1/2/3+WGTKNLQARVTAIEKYLQDQA  
RLNSWGCAFRQVCHTTVPWVNDLAPDWDNMTWQEWQVRYLEANISKSLEQAQIQQEKNMVELQKLSWDIFGNWFDLTSWVKN+1/2/3+-YIQYG  
VLIIVAVIALRIVIVVQMLSRLRKGYRPVFSSPPGYIQQIHKKDRGQ-SPANEEETEEDGGSNGGDRYWPWP+1/2/3+IAYI-HFLIRQLIRLLTRL  
YSICRDLRSFSLTLQLIYQNLRDWLRLRTAFLQYGCWEIQEAFQAAARATRETLAGACRGLWRVLERIGRGILAVPRRIRQGAETALL-

Legende: - bzw. - ≡ Anfang bzw. Ende einer möglichen Deletion

+A/B+ ≡ Mögliche Einfügestellen (Insertionsstellen) einer AS-Sequenz mit der Seq ID A und/oder B

#### 4. Beispielproteine aus der Permutationstabelle (A, B und C) und andere (D und E)

A. pol 2  $\Delta$  100/40, 140/23, 163/14  $\Omega$  31/2, 100/3 (253 AS)

MFLDGIDKAQDEHEKYHSNWRAMASDFNLPPGPKARRIKGMRVRVKAGVVAKEIVASCDKQCKGEAMHGQVDCSPGIWQLDCTHLEGVILVAVHV  
ASGYIEAEVIPAETGQETAYGACIKHRYKRRDRRKHKKVACIGOMAVFIHFKRGIGGYSAGERIVDIIATDIQTKELQKQITKIQNERVYRDSRNP  
LWKGPAKLLWKGEGAVVIQDNSDIKVVPRRKAIIIRDYKQMGAGDDCVASRQDED

B. env 2  $\Delta$  47/25, 210/5, 215/25, 240/23, 286/58, 344/48  $\Omega$  215/11 (232 AS)

MGSDMRDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKRRVVQREKRAVGIGSRQLLSGIVQQNNLLRAIEAQHLLQLTVWGIKQLQARILAVERYLKDQQLL  
GIWCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNNTSLIHSLIEESQOQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLAMEKYLKDOARLN  
SWGCAFRQVCHDRPEGIEEGGERDRDRSIRLVN

C. env 2  $\Delta$  47/25, 210/5, 215/25, 240/23, 286/58, 344/48  $\Omega$  8/6, 215/11 (254 AS)

MGSDMRDNWIQNQLNLWGCKGRVLCYTNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKRRVVQREKRAVGIGSRQLLSGIVQQNNLLRAIEAQHLLQLTVW  
GIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWCSGKLICTTAVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNNTSLIHSLIEESQOQEKNEQELLELDKWASLW  
NWFNITNWLAMEKYLKDOARLNSWGCAFRQVCHDRPEGIEEGGERDRDRSIRLVN

D. AS (M) + Seq ID (1+37+24+38+2+37+32+38+3+37+27+38+2+37+25+38+1) (297 AS)

MGKRAHKSRIKRVTRRGAVGIGINCTRPNNTRKSVRIGPGQAFYATGDIIGDIRQAHCNIGPTPTGWKKNRRLKGKYRRMKGAVGIGINCTRPNN  
NHTRKSIHIGPGRFYATSGDIIIGDIRQAHCNIGPTPTGACVKHRQKRKEKRYKTACVGA VGIGINCTRPNNTRKSIHLGPGQAFYATGDGDIIGDI  
RQAHCNIGPTPTGSKKARRIKGKMRRLLKVGAVGIGINCTRPNNNGHTRKSIRIGPGQTFYATGDIIGDIRQAHCNIGPTPTGKRAVKSRYKRHIRRG

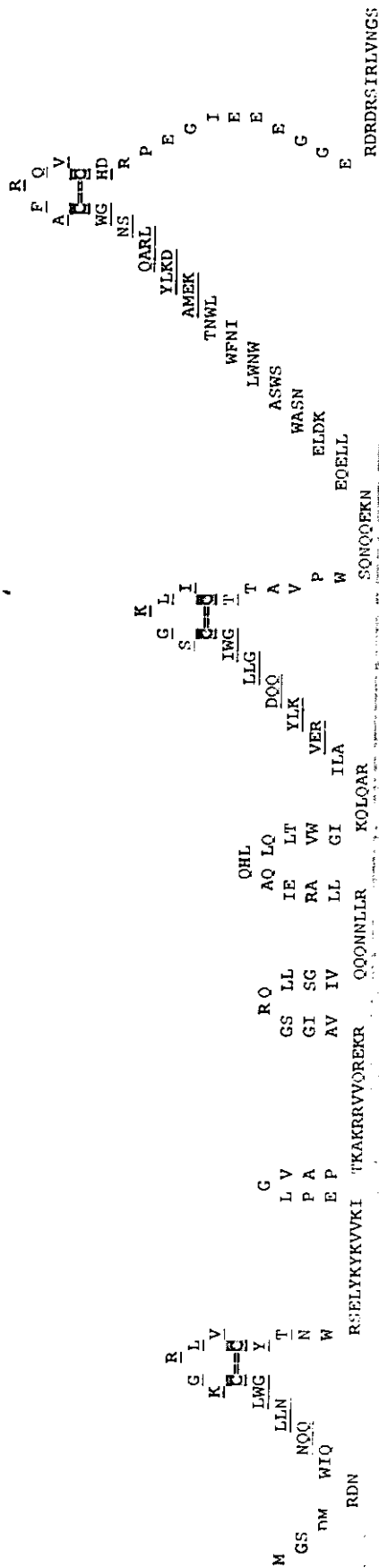
E. env 4 (221 AS)

MGSDMRDNWRSELYKYKVVKIEPLGVAPTAKRRVVQREALETLQNQQILNLWGCKGRLLICYWGIKQLQARILAVERYLKDQQLLGIWCSGKLICTT  
AVPWNASWSNKSLEQIWNMTWMEWDREINNNTSLIHSLIEESQOQEKNEQELLELDKWASLWNWFNITNWLAEIKYLKDOARLNSWGCAFRQVCHDR  
PEGIEEGGERDRDRSIRLVNGS

## 5. Bindung von Proteinen an die Nitrozellulosemembran

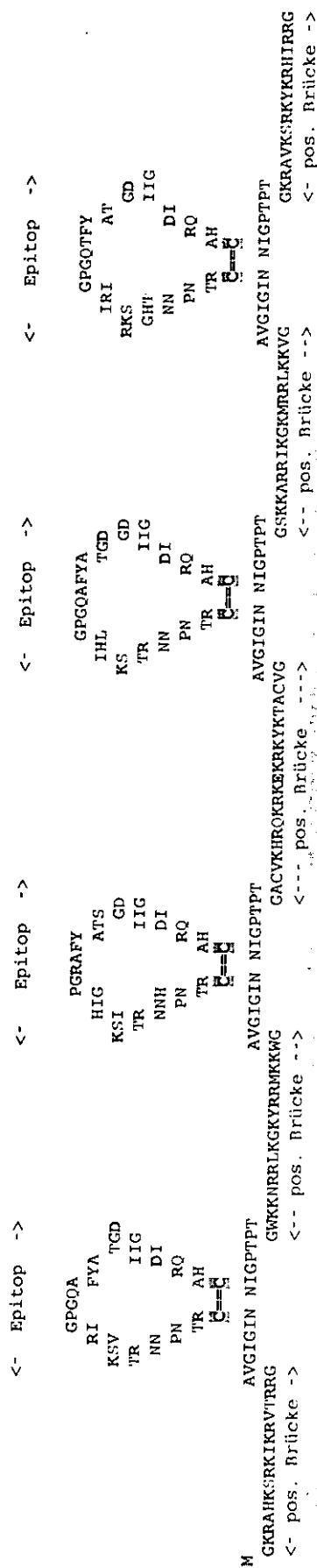
### A. Positive Beispiele (4.C. und 4.D.):

→ 4.C.: env 2  $\Delta_{47/25}$ , 210/5, 215/25, 240/23, 286/58, 344/48  $\Omega_{8/6}$ , 215/11



NITROZELLULOSEMEMBRAN

→ 4. D.: AS(M) + Seq ID (1+37+24+38+2+37+32+38+3+37+27+38+2+37+25+38+1)

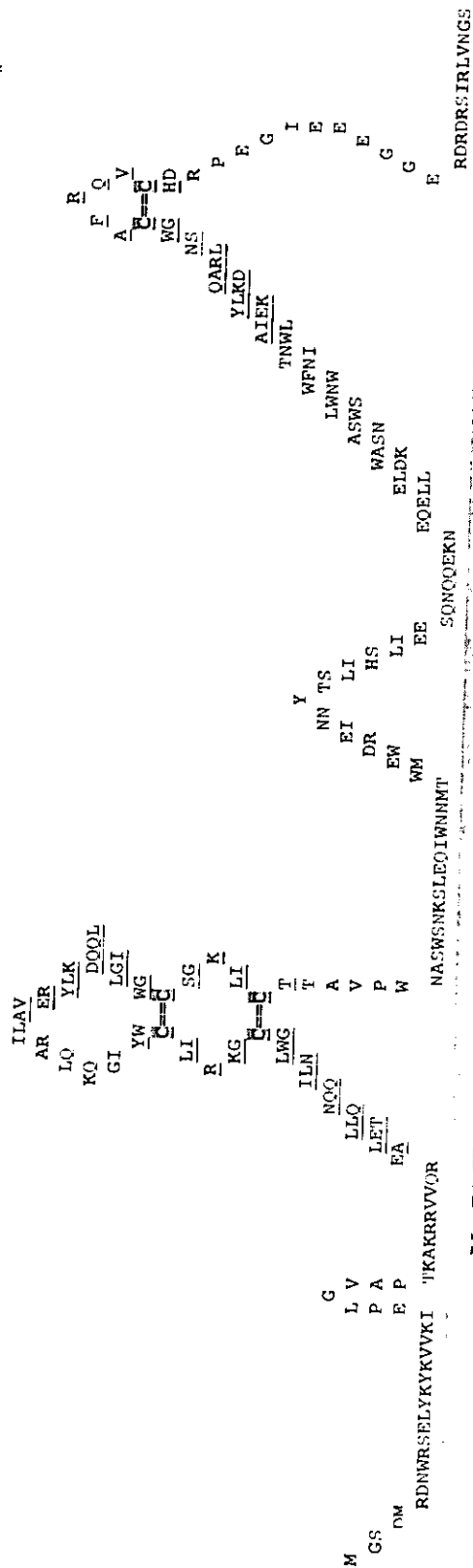


NITROZELLULOSEM BRAN

Fig. 3

5

B. Negatives Beispiel (4.E.): env 4



# NITROZELLULOSEMEMBRAN

- Legende:
  - Aminosäure in rot
  - Aminosäure in blau
  - Aminosäure in grün
  - positiv geladene Aminosäure
  - negativ geladene Aminosäure
  - polare Aminosäure
  - Brückenbindung von zwei Cysteinen



A DOCPHOENIX

# APPL PARTS

IMIS \_\_\_\_\_  
 Internal Misc. Paper  
 LET. \_\_\_\_\_  
 Misc. Incoming Letter  
 371P \_\_\_\_\_  
 PCT Papers in a 371 Application  
 A... \_\_\_\_\_  
 Amendment Including Elections  
 ABST \_\_\_\_\_  
 Abstract  
 ADS \_\_\_\_\_  
 Application Data Sheet  
 AF/D \_\_\_\_\_  
 Affidavit or Exhibit Received  
 APPENDIX \_\_\_\_\_  
 Appendix  
 ARTIFACT \_\_\_\_\_  
 Artifact  
 BIB \_\_\_\_\_  
 Bib Data Sheet  
 CLM \_\_\_\_\_  
 Claim  
 COMPUTER \_\_\_\_\_  
 Computer Program Listing  
 CRFL \_\_\_\_\_  
 All CRF Papers for Backfile  
 DIST \_\_\_\_\_  
 Terminal Disclaimer Filed  
 DRW \_\_\_\_\_  
 Drawings  
 FOR \_\_\_\_\_  
 Foreign Reference  
 FRPR \_\_\_\_\_  
 Foreign Priority Papers  
 IDS \_\_\_\_\_  
 IDS Including 1449

NPL \_\_\_\_\_  
 Non-Patent Literature  
 OATH \_\_\_\_\_  
 Oath or Declaration  
 PET. \_\_\_\_\_  
 Petition  
 RETMAIL \_\_\_\_\_  
 Mail Returned by USPS  
 SEQLIST \_\_\_\_\_  
 Sequence Listing  
 SPEC \_\_\_\_\_  
 Specification  
 SPEC NO \_\_\_\_\_  
 Specification Not in English  
 TRNA \_\_\_\_\_  
 Transmittal New Application

CTNF \_\_\_\_\_  
 Count Non-Final  
 CTRS \_\_\_\_\_  
 Count Restriction  
 EXIN \_\_\_\_\_  
 Examiner Interview  
 M903 \_\_\_\_\_  
 DO/EO Acceptance  
 M905 \_\_\_\_\_  
 DO/EO Missing Requirement  
 NFDR \_\_\_\_\_  
 Formal Drawing Required  
 NOA \_\_\_\_\_  
 Notice of Allowance  
 PETDEC \_\_\_\_\_  
 Petition Decision

## OUTGOING

CTMS \_\_\_\_\_  
 Misc. Office Action  
 1449 \_\_\_\_\_  
 Signed 1449  
 892 \_\_\_\_\_  
 892  
 ABN \_\_\_\_\_  
 Abandonment  
 APDEC \_\_\_\_\_  
 Board of Appeals Decision  
 APEA \_\_\_\_\_  
 Examiner Answer  
 CTAV \_\_\_\_\_  
 Count Advisory Action  
 CTEQ \_\_\_\_\_  
 Count Ex parte Quayle  
 CTFR \_\_\_\_\_  
 Count Final Rejection

## INCOMING

AP.B \_\_\_\_\_  
 Appeal Brief  
 C.AD \_\_\_\_\_  
 Change of Address  
 N/AP \_\_\_\_\_  
 Notice of Appeal  
 PA.. \_\_\_\_\_  
 Change in Power of Attorney  
 REM \_\_\_\_\_  
 Applicant Remarks in Amendment  
 XT/ \_\_\_\_\_  
 Extension of Time filed separate

### Internal

SRNT \_\_\_\_\_  
 Examiner Search Notes  
 CLMPTO \_\_\_\_\_  
 PTO Prepared Complete Claim Set

ECBOX \_\_\_\_\_  
 Evidence Copy Box Identification  
 WCLM \_\_\_\_\_  
 Claim Worksheet  
 WFEE \_\_\_\_\_  
 Fee Worksheet

### File Wrapper

FWCLM \_\_\_\_\_  
 File Wrapper Claim  
 IIFW \_\_\_\_\_  
 File Wrapper Issue Information  
 SRFW \_\_\_\_\_  
 File Wrapper Search Info